

UNTERSUCHUNGEN ZUR DISSOZIIERBARKEIT
UND KETTENCHARAKTERISIERUNG
VON ISOLIERTEN UMSATZPRODUKTEN
DES FIBRINOGENS AUS PATIENTENPLASMA

Christoph Böhm

1976

Aus der I. Frauenklinik und Hebammenschule
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. J. Zander

UNTERSUCHUNGEN ZUR DISSOZIIERBARKEIT UND KETTEN-
CHARAKTERISIERUNG VON ISOLIERTEN UMSATZPRODUKTEN
DES FIBRINOGENS AUS PATIENTENPLASMA

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von
Christoph Böhm
aus
Köln

— 1976 —

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.H.Graeff

Mitberichterstatter: Prof.Dr.J.Zander

Dekan: Prof.Dr.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 7.12.76



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung	1
I.1 Chemischer Aufbau des Fibrinogen	1
I.2 Gerinnungsvorgang	2
I.3 Fibrinolyse	3
II Zur Pathophysiologie der Gerinnung	5
II.1 Hyperkoagulabilität	5
II.2 Disseminierte intravaskuläre Gerinnung	7
III Fragestellung	7
B. Material und Methoden	9
I. Art des Untersuchungsmaterials	9
II. Methoden	9
II.1 Blutentnahme	9
II.2 Fibrinogenbestimmung	10
II.3 Äthanoltest	11
II.4 Anreicherung von Fibrinogen und seinen Derivaten	11
II.5 Agarose-Gelfiltration	12
II.6 Berechnung des relativen und absoluten Gehaltes an LFMK im Plasma	13
II.7 SDS-PAA-Disk-Elektrophorese	13
a) Vorbereitung der Proben	13
b) Herstellung der Gele	14
c) Herstellung des Laufpuffers	16
d) Beschreibung der Elektrophoresekammer	16
e) Auftragen und elektrophoretische Trennung der Proben	16
f) Färbung und Entfärbung der Gele	17
g) Dokumentation	18
C. Ergebnisse	19
I. Beschreibung der Elektrophorese im Verlauf einer Gelfiltration bei Äthanoltest-negativem Plasma	19
I.1 Nicht reduzierte Fraktionen	19
I.2 Reduzierte Fraktionen	21

II. Fallbeschreibungen	25
II.1 Der Fall eines Reptilase-behandelten Dead-Fetus-Syndroms	25
II.2 Der Fall einer Urosepsis ohne klinische Schockzeichen	30
II.3 Der Fall eines beginnenden Endotoxinschocks bei septischem Abort	32
II.4 Tumorpatientinnen	37
II.5 Kaninchen unter Endotoxininfusion	38
D. Diskussion	40
E. Zusammenfassung	46
F. Literatur	47

A. EINLEITUNG

I.1 Chemischer Aufbau des Fibrinogen

Fibrinogen wird in den Parenchymzellen der Leber synthetisiert. Seine Konzentration im Blut schwankt zwischen 200 und 400 mg% (1). Die Molekulargewichtsangaben in der Literatur variieren zwischen 320000 und 400000. Am häufigsten wird ein Wert um etwa 340000 angegeben (2-5).

Das Molekül besteht aus 6 Untereinheiten (Ketten): je zwei α (A)-, β (B)- und γ -Ketten, die durch Disulfidbrücken mit- und untereinander verbunden sind und durch Sulfitololyse voneinander getrennt werden können. Das Fibrinogenmolekül hat also eine dimere Struktur.

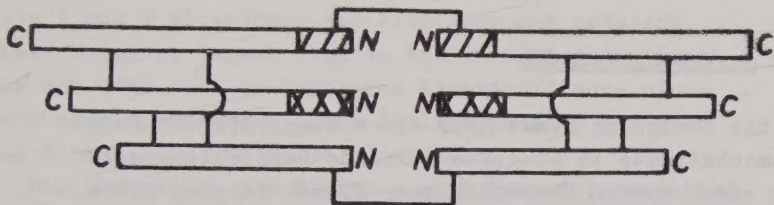


Abb.1: Schematische Struktur des Fibrinogens in Anlehnung an Marder u. Mitarb.

Die eingezeichneten Peptide A (schraffierte Fläche) und B (doppelt schraffierte Fläche) können unter Einwirkung von Thrombin abgespalten werden (s.u.). Der mittlere Bezirk des Moleküls wird nach Blombäck "Disulfid-Knoten" genannt (6), nachdem von insgesamt 28 Disulfidbrücken 11 in diesem Teil gefunden wurden. Die genaue Lage dieser Brücken ist z.T. noch nicht bekannt.

Die Molekulargewichte der einzelnen Ketten werden von verschiedenen Autoren unterschiedlich angegeben: α (A) von 62000 - 75000, β (B) von 56000 - 68000, γ von 45000 - 53000 (3,7,8).

Vorstellungen über die dreidimensionale Konfiguration des Fibrinogens wurden vor allem aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen gewonnen. So beschreiben

Hall und Slayter es als ein hantelförmiges Gebilde mit einer Ausweitung in der Mitte des Moleküls (9).

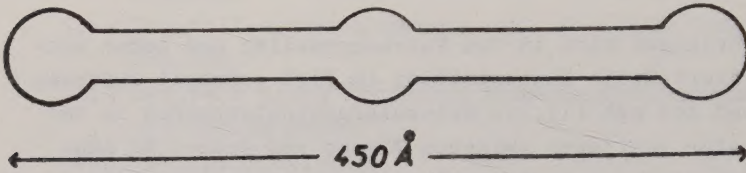


Abb.2: Schematische Darstellung des Fibrinogens nach Hall und Slayter

Bachmann und Schmidt-Fumian geben ein zylindrisches Modell an (10).

I.2 Gerinnungsvorgang

Die Gerinnung kommt über einen komplizierten Kaskadenmechanismus in Gang. Die folgende Darstellung will nur einen kurzen Überblick über diesen Vorgang geben.

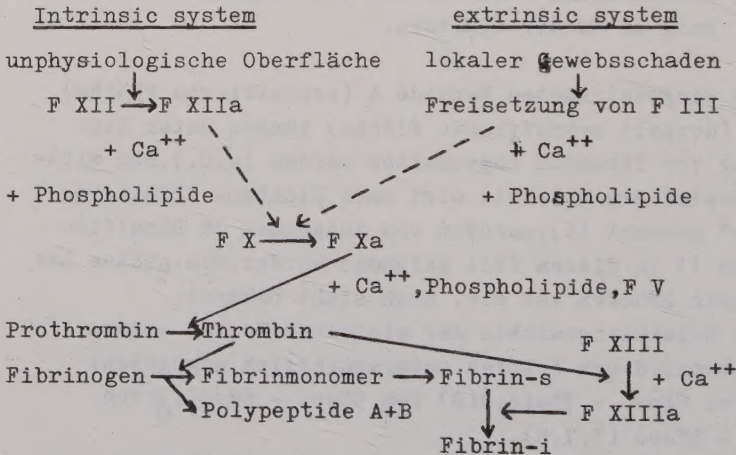


Abb.3: Vereinfachte Darstellung des Gerinnungsablaufes (Die gestrichelten Pfeile zeigen eine Wirkung über nicht eingetragene Zwischenschritte an)

Ausgelöst wird die Gerinnung entweder über das extrinsic oder das intrinsic system. Im extrinsic system führt ein lokaler Gewebsschaden zur Freisetzung von Faktor III (Gewebsthromboplastin), der den Faktor X in die aktive Form Xa überführt.

Im intrinsic system wird der Faktor X über ein Kaskadensystem zu Faktor Xa aktiviert. Auslösendes Moment ist hierbei wahrscheinlich der Kontakt von Faktor XII (Hageman-Faktor) mit unphysiologischen Oberflächen.

In beiden Fällen wird dann unter Einfluß von Faktor Xa Prothrombin (F II) in Thrombin (F IIa) überführt. Die meisten dieser Reaktionen benötigen Ca^{++} und bestimmte Phospholipide als Cofaktoren.

Thrombin spaltet dann vom Fibrinogen (F I) die Peptide A und B ab, wodurch ein Fibrinmonomer entsteht. Diese Monomere lagern sich zu Fibrin-Aggregaten zusammen und sind noch in 5-molarer Harnstofflösung, einem H-Brücken sprengendem Agens löslich, weshalb man auch von Fibrin-s (s für soluble) spricht.

Die Umwandlung von Fibrin-s zu Fibrin-i (insoluble) erfolgt unter dem Einfluß von Faktor XIIIa, dem Fibrin-stabilisierendem-Faktor (FSF), der ebenfalls von Thrombin aktiviert wird. Auf Grund von Untersuchungen von Lorand wird angenommen, daß kovalente Bindungen zwischen den ϵ -Aminogruppen spezifischer Lysinreste eines Fibrinmonomeren und den Amidgruppen bestimmter Glutaminreste eines anderen durch Transamidierungsreaktion entstehen (11). Arbeiten verschiedener Autoren ergaben, daß diese Quervernetzungen hauptsächlich zwischen den γ -Ketten zustande kommen, es wurden allerdings auch α - α - und α - γ -Verknüpfungen gefunden (11-13).

Die letzte Phase der Gerinnung bildet die Retraktion des Gerinnsels. Dabei wird das Fibrin-i in seiner chemischen Struktur nicht mehr verändert.

I.3 Fibrinolyse

Das wichtigste Enzym für den Abbau von Fibrin und auch von Fibrinogen ist das Plasmin. Die Vorstufe die-

ses Polypeptides, Plasminogen genannt, kann durch Autokatalyse, verschiedene Gewebsfaktoren, Urokinase, Streptokinase oder Trypsin aktiviert werden. Umgekehrt wirken Antiplasmin, ϵ -Aminocaprinsäure und Ca^{++} -Ionen hemmend auf die Aktivierung von Plasmin (14,15).

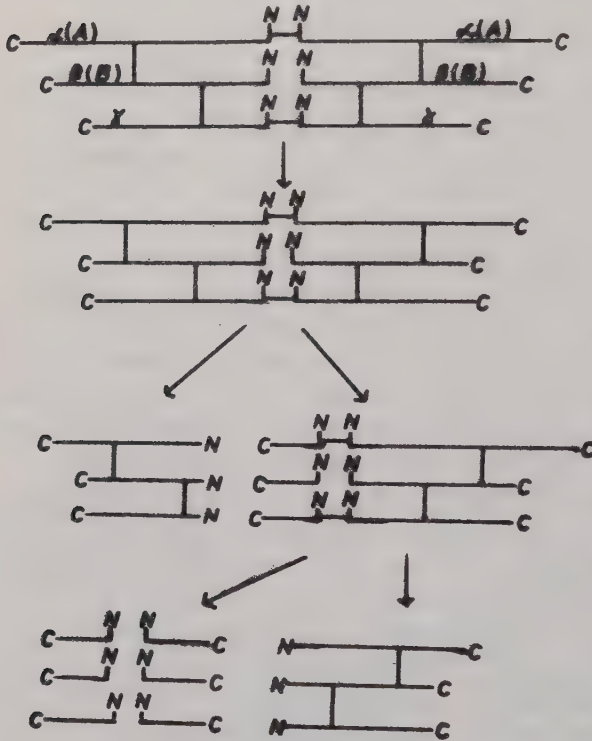


Abb.4: Schema des Fibrinogenabbaus nach Marder u. Mitarb.

Die Arbeiten Pizzo (16) und Marder (17) beschreiben den Fibrin- und Fibrinogenabbau wie folgt:

Im ersten Schritt wird von der α -Kette am C-terminalen Ende ein größeres Stück abgebaut, als nächstes von der B-Kette, ebenfalls am C-terminalen Ende, ein kleineres

res Stück. Das entstandene Fibrinabbauprodukt wird Fragment X genannt. Von diesem wird dann von der einen Hälfte ein Fragment D (MG 90000) abgespalten. Vom verbliebenen Fragment Y wird dann in einem nächsten Schritt noch ein solches Fragment D abgespalten, zurück bleibt das Fragment E (MG 45000), das mit dem Blombäck-schen Disulfidknoten zum größten Teil übereinstimmt (17).

II. Zur Pathophysiologie der Gerinnung

II.1 Hyperkoagulabilität

In der Frauenheilkunde und Geburtshilfe spielen pathologische Gerinnungsvorgänge eine nicht unbedeutende Rolle. Dies wurde gerade auch an der I. Universitäts-Frauenklinik München von verschiedenen Mitarbeitern gezeigt (18-29).

Es wurde dabei vor allem auf die Früherkennung großer Wert gelegt. Hier ist ein wichtiger Begriff der der "Hyperkoagulabilität". Hierunter hat man ganz allgemein einen Zustand mit erhöhten Spiegeln an gerinnungsfördernden Substanzen im Plasma bei gleichzeitig verminderter fibrinolytischer Aktivität zu verstehen. Marx spricht von Hyperkoagulabilität 1. Grades (30). Als Hyperkoagulabilität 2. Grades bezeichnet er in der selben Arbeit das Auftreten von Zwischen- und Endprodukten der Gerinnung im Plasma.

Fletcher u. Mitarb. gelang es als erstem, Fibrinogenabbauprodukte im Plasma von "Hyperkoagulabilitätspatienten" nachzuweisen (32). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Graeff u. Mitarb. (19-25). Graeff war es auch, der diese Derivate als lösliche Fibrinmonomerkomplexe (LFMK) bezeichnete, da er dabei von der Vorstellung ausging, daß sie nur unter Einwirkung von Thrombin entstanden sein konnten.

Als Screening Methode zur Erfassung von Hyperkoagu-

labilitätszuständen hat sich der Äthanoltest nach Godal und Abildgaard bewährt (31). In diesem Test werden Zwischenprodukte der Fibrinogen-Fibrin-Umwandlung (Fibrinmonomerkomplexe) nachgewiesen. Es stellte sich jedoch bald heraus, daß dieser Test genauere quantitative Rückschlüsse nicht zuließ. So fällt z.B. bei niedrigerer LFMK-Konzentration der Test negativ aus und bei positivem Ausfall läßt sich nicht sagen, in welchem Ausmaß sich LFMK in der Blutbahn befinden.

Eine Möglichkeit, genauere quantitative Aussagen über die Hyperkoagulabilität zu machen, konnte mit Hilfe der Agarose-Gelfiltration von aus Plasma gefällttem Gesamtfibrinogen (=Fibrinogen + LFMK) und der photometrischen Auswertung der dabei erhaltenen Fraktionen verwirklicht werden. Die Agarose-Gelfiltration beruht auf dem Molekularsiebeffekt, d.h. höhermolekulare Komponenten werden zuerst eluiert. Man erhält dabei eine Kurve mit etwa folgendem Aussehen:

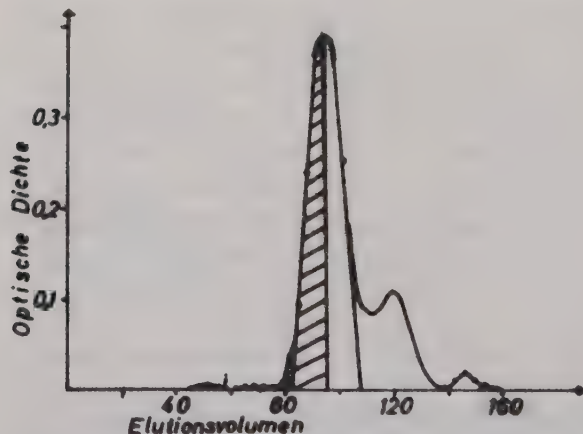


Abb.5: Optische Dichte (bei $\Delta E_{280-325 \text{ nm}}$) in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen nach Agarose-Gelfiltration (Äthanoltest-negatives Plasma)

Der zur Hälfte schraffierte Gipfel bildet dabei den "Fibrinogenpeak". In diesen Fraktionen wird Fibrinogen eluiert. In den Fraktionen vor diesem Peak, der Vorschulter (punktierte Fläche) erscheinen nach Untersuchungen von Graeff und v. Hugo die LFMK (33). Durch planimetrische Auswertung dieser beiden Flächen läßt sich der Anteil der LFMK am Gesamtfibrinogen errechnen.

II.2 Disseminierte intravaskuläre Gerinnung

Während bei der Hyperkoagulabilität die fibrinolytische Aktivität noch ausreicht, ein Ausfallen von Fibrinogenabbauprodukten in der kapillaren Endstrombahn zu verhindern, versteht man unter intravaskulärer Gerinnung ein generalisiertes Ausfallen von Fibrin vor allem in den Kapillaren (mit klinischen Folgen wie z.B. einem akuten Nierenversagen). Dabei kommt es durch den hohen Verbrauch von Fibrinogen zu einem u.U. extremen Abfall der Fibrinogenkonzentration im Plasma. Deshalb spricht man auch von einer Verbrauchskoagulopathie. Während die LFMK der Hyperkoagulabilität aber in gesättigter (5-molarer) Harnstofflösung noch dissoziieren, erscheint in der Vorschulter und auch schon im Ausschlußvolumen bei DIG neben den LFMK ein in Harnstoff nicht mehr löslicher, d.h. kovalent gebundener Komplex, bei dem es sich um ein Plasminderivat quervernetzten Fibrins handeln dürfte (18).

III. Fragestellung

Aufgabe dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob eine Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese der nach Gelfiltration von Plasmen einzelner Patienten erhaltenen Fraktionen in Harnstoff und SDS (Na-Dodecylsulfat) möglich ist.

Die PAA-Disk-Elektrophorese beruht auf dem Molekularsiebeffekt. Moleküle, die durch das Gel wandern, haben

je nach Größe einen verschieden hohen Reibungswiderstand zu überwinden, der auf die Auftrennung einen größeren Einfluß hat als elektrostatische Unterschiede der Moleküle.

Man muß sich das Gel als ein Gitterwerk vorstellen, das eine, je nach Gelkonzentration verschiedene Maschenweite besitzt, in denen höhermolekulare Teilchen leichter hängenbleiben als niedermolekulare. Den Molekularsiebeffekt kann man im Vergleich zum elektrostatischen Effekt noch verstärken, indem man die Ladung der Teilchen einander angleicht. Dies kann z.B. durch Zugabe von SDS geschehen.

Die früheren Untersuchungen wurden alle mit Hilfe der PAA-Flachgelelektrophorese vorgenommen. Läufe in Gegenwart von SDS waren dabei aus technischen Gründen nicht möglich.

Außerdem sollten die einzelnen Fibrinogenketten nach Reduktion der Disulfidbrücken im Gesamtmolekül im Verlauf einer Gelfiltration beschrieben und auf evtl. Quervernetzungen hin untersucht werden.

B. MATERIAL UND METHODEN

I. Art des Untersuchungsmaterials

Die Auswahl der Plasmaspender wurde nicht nach statistischen Gesetzmäßigkeiten getroffen, da nur Material zur Veranschaulichung der Methoden benötigt wurde.

Untersucht wurden vor allem Plasmen von solchen Patientinnen, bei denen ein verstärkter Hyperkoagulabilitätszustand oder gar das Vorliegen einer DIG auf Grund von klinischen Anzeichen vermutet wurde. Da zur gleichen Zeit auch Dissertationsarbeiten über das quantitative Verhalten der LFMK bei Schwangerschafts- und Geburtskomplikationen (F. Bauer) und vor und nach Operationen bei Tumorpatienten aus der Gynäkologie (M. Dreiser) durchgeführt wurden, stammt der größte Teil des Materials aus den Gelfiltrationen dieser beiden Patientengruppen.

Zusätzlich wurden einige Patientinnen mit beginnendem Endotoxinschock und schwangere Kaninchen unter Endotoxininfusion untersucht.

II. Methoden

II.1 Blutentnahme

Aus der vena cubitalis wurden 9 ml Blut mit einer 10 ml-Einmalspritze, die 1 ml Citrat-Trasylool-Gemisch pH 7,5 enthielt und einer Kanüle Nr.1 gesammelt und sofort gemischt. Es wurde darauf geachtet, die Vene beim ersten Anstich zu punktieren, um keine störenden Nebenwirkungen durch Gewebsfaktoren zu haben.

Das Citrat-Trasylool-Gemisch enthielt:

0,129 m Tri-Na-Citrat

0,06 m TES (= Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-amino-
äthan-sulfonsäure

10 ml Trasylool = 100000 KIE

aqua bidest. ad 100 ml

Von dieser Probe wurde Hämatokrit (mit Micro-Hematocrit-Tubes) und Thrombozytenzahl (nach Feissly und Ludin (27)) bestimmt, wobei der Verdünnungseffekt durch das Citrat-Trasylol-Gemisch zu berücksichtigen war.

Im Anschluß daran wurde plättchenarmes Plasma durch 20-minütiges Zentrifugieren bei 3000 Upm (=1200 g) und 4°C gewonnen.

II.2 Fibrinogenbestimmung

Die Festimmung des Fibrinogengehaltes im Plasma erfolgte in Anlehnung an die Methode von Blombäck u. Blombäck (34).

0,5 ml Plasma wurde mit 2,5 ml Phosphatpuffer (0,01 m; 0,15 m an NaCl; pH 6,35) und 0,15 ml Thrombinlösung (4,5 NIH Test-Thrombin, ORHT, Behringwerke, Marburg) versetzt. Nach zwei Stunden wurde das Fibringerinnsel mit einem Glashäkchen entnommen, auf einem Nylongewebe syneräsiert, dreimal mit 0,15 m NaCl-Lösung gewaschen und in 10 ml 40 %iger Harnstofflösung (0,2 m an NaCl) gelöst. Nach Zusatz von 1 ml 0,3 m NaCl-Lösung wurde die optische Dichte in einer Quarzküvette bei 280 und 325 nm gegen eine Blindlösung gemessen (Spektralphotometer Hitachi 181).

Die Berechnung erfolgte nach der Formel:

$$\text{mg F'gen/ml} = \Delta E_{280-325 \text{ nm}} \times 6,927 \times 2$$

Der Faktor 6,927 errechnet sich aus dem Extinktionskoeffizienten für Fibrinogen in Alkali von 15,87 ($\Delta E_{1\text{cm}}^{1\%}$) nach Hörmann und Gollwitzer (35). Die Fibrinogenwerte wurden noch um die Antikoagulanzenverdünnung korrigiert, wobei entsprechend den Überlegungen von Seligsohn u. Mitarb. (36) nach folgender Formel der Hämatokrit mitberücksichtigt wurde:

$$\text{mg\% F'gen (korr.)} = \text{mg\% F'gen} \times \frac{100 - \text{Hkt}}{(100 - \text{Hkt}) - 10}, \text{ wobei}$$

Hkt für nicht korrigierten Hämatokrit steht. Die Fibrinogenbestimmungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

II.3 Äthanoltest

Der Äthanoltest erfolgte nach Godal und Abildgaard (31) in der Modifikation nach Kuhn und Graeff (27).

Zu plättchenarmen Plasma wird eine Äthanol-Puffer-Lösung zugegeben, da angenommen wird, daß durch den Test im zirkulierenden Blut vorhandene LFMK nachgewiesen werden. Durch die Äthanolzugabe werden sie in ihrem Löslichkeitsverhalten beeinflusst und präzipitieren unter Ausbildung eines Fadens bzw. gelartigen Gerinnsels. Der Test wurde einfach positiv (+) gewertet beim Auftreten von einzelnen Fädchen und zweifach positiv (++) bei stärkerer Flockenbildung. Dreifach positiv (+++) gewertet wurde der Test bei Gelbildung, was dem Kriterium für positiv nach Godal und Abildgaard entspricht. Trübungen ohne partikuläre Abscheidungen wurden als negativ eingestuft.

Oben erwähnte Äthanol-Puffer-Lösung erhält man durch Zugabe von 350 ml aqua bidest. zu 13,7 g TES. Mit 1/10 n NaOH-Lösung wird pH 7,8 eingestellt und mit aqua bidest. auf 500 ml aufgefüllt. Anschließend werden 500 ml 98 %-iger Äthanol zugegeben.

Die Ausführung des Tests geschieht, indem zu 0,5 ml plättchenarmen Plasma 0,15 ml dieser Lösung zugegeben und kurz sanft geschüttelt wird. Nach genau 10 Minuten wird mit einer Platinöse geprüft, ob ein Faden oder ein gelartiges Gerinnsel aufgetreten ist.

Zu beachten ist, daß der Test 2 Stunden nach Blutentnahme beendet sein muß, da sonst mit falschen Werten zu rechnen ist (37).

II.4 Anreicherung von Fibrinogen und seinen Derivaten durch Fällung mit β -Alanin

Zu je 2,5 ml Plasma werden unter Rühren im Eiswasserbad innerhalb von 10 Minuten 3 ml 40 %ige β -Alanin-Lösung zugetropft (Endkonzentration 2,5 m). Nach weiterem

10-minütigem Rühren wurde der Niederschlag bei 2000 g (20 min., 4° C) abzentrifugiert und in 1ml TES-Trasyllol-Citrat-Puffer, pH 7,5, unter Rühren bei Raumtemperatur wieder aufgelöst. Eine eventuelle Trübung, die gelegentlich entstand, wurde durch Zentrifugieren bei Raumtemperatur mittels einer Tischzentrifuge (Hettich EBA III) entfernt. Dieser Rückstand konnte in gesättigter Harnstofflösung wiederaufgelöst werden und wird in dieser Arbeit mit β -Ala-Rückstand bezeichnet.

Der TES-Trasyllol-Citrat-Puffer bestand aus:

0,06 m TES

0,081 m NaCl

0,0129 m tri-Na-Citrat

100 KIE Trasyllol/ml; pH 7,5

II.5 Agarose-Gelfiltration

Die Gelfiltration erfolgte an 4 %iger Agarose (Biogel A-15 m, 100-200 mesh, Bio-Rad Lab., München).

1 ml Probe, die 5-8 mg Protein enthielt, wurde auf 1,5 x 80 cm Säulen aufgetragen und mit Tris-Cl-Citrat-Puffer, pH 7,6, eluiert. Die Durchflussrate betrug 13 ml/h. Das Eluat wurde mittels eines automatischen Fraktionsammlers in Fraktionen zu je 3 ml aufgefangen. Eventuelle Doppelbestimmungen wurden unter gleichzeitiger Verwendung zweier Säulen durchgeführt.

Die optische Dichte der Fraktionen wurde bei 280 und 325 nm mit einem Spektralphotometer Hitachi 181 gemessen und die Differenz $\Delta E_{280-325 \text{ nm}}$ für jede Fraktion auf Millimeterpapier aufgetragen.

Der Tris-Cl-Citrat-Puffer bestand aus:

0,05 m Tris

0,116 m NaCl

0,0129 m tri-Na-Citrat

0,2 m ϵ -amino-capronsäure (EACA)

0,025 % Na-Azid, mit HCl auf pH 7,6 eingestellt.

II.6 Berechnung des relativen (Prozent des Gesamtfibrinogengehaltes) und absoluten Gehaltes an LFMK im Plasma

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß LFMK in einer Schulter vor dem Fibrinogenpeak, zwischen Ausschlußvolumen und aufsteigendem Schenkel des Fibrinogenpeaks eluiert werden (38). Es handelt sich hierbei hauptsächlich um eine Komponente, die in der PAA-Flachgel-Elektrophorese eine relative elektrophoretische Beweglichkeit von $0,28 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{v} \times \text{sec}$ besitzt und auf Grund ihres Wanderungsverhaltens als Dimer des Fibrinogen (Fibrinogen-Fibrinmonomer-Komplex) angesehen wurde. Daneben wurden auch noch Banden mit höherem Teilchengewicht (Oligomere) beobachtet (21).

Dieser Teil des Elutionsvolumens wurde planimetriert und mit der Fläche des Fibrinogenpeaks verglichen. Das Planimetrieren erfolgte durch Ausschneiden der entsprechenden Kurvenabschnitte und Auswiegen der Papierabschnitte auf einer Analysenwaage. Der Prozentgehalt an LFMK am Gesamtfibrinogen errechnet sich nach folgender Formel: $\% \text{ LFMK} = \frac{\text{Fläche der Vorschulter}}{\text{Fläche von Vorschulter} + \text{F'genpeak}} \times 100$, wobei die Flächen in mg in die Formel eingesetzt werden. Der absolute Gehalt an LFMK in mg% Plasma errechnet sich wie folgt: $\text{LFMK (mg\%)} = \% \text{ LFMK} \times \text{mg\% (F'gen)}/100$.

II.7 SDS-PAA-Disk-Elektrophorese

a) Vorbereitung der Proben

Nach Beendigung der Gelfiltration und Photometrierung der einzelnen Proben wurden jedem Gläschen aus Ausschlußvolumen, Vorschulter und Peak, die je 3 ml Eluat enthielten 300 KIE Trasylol zur Vermeidung eines Abbaus von Fibrinogen und seiner Derivate durch Plasmin zugegeben.

Im Anschluß daran wurden Fraktionen, die ein

$\Delta E_{280-325 \text{ nm}}$ von weniger als 0,1 aufwiesen mit 1-2 benachbarten Fraktionen gepoolt und zur Gewinnung einer höheren Konzentration eingeengt. Dies geschah bei den ersten Versuchen durch Dialyse gegen eine gesättigte Polyäthylenglykol-Lösung, bis ein Volumen von etwa 1,5 ml erreicht war. Später wurde die Einengung dann mit Hilfe eines Vakuum-Rotationsverdampfers bei 37°C durchgeführt. Auch bei diesem Verfahren wurde ein Volumen von ca. 1,5 ml angestrebt.

Falls die Proben nicht sofort elektrophoretisch untersucht werden konnten, wurden sie bis zur weiteren Verarbeitung bei -25°C tiefgefroren.

Vor dem Auftragen der Proben wurden die einzelnen Fraktionen mit Harnstoff bis zur Sättigung und mit 2-3 Körnchen SDS versetzt.

Zur Reduzierung der Disulfidbrücken im Fibrinogenmolekül wurde Mercaptoäthanol (MCA) benutzt, von dem 0,01 ml zu jeder Fraktion von 3 ml zugegeben und dann mindestens 60 Minuten bei 56°C inkubiert wurde.

b) Herstellung der Gele

Vorauszuschicken wäre, daß auf die Verwendung eines Sammel- oder Konzentrierungsgels verzichtet wurde, da in Vorversuchen festgestellt worden war, daß ein solches zusätzliches Gel keine besonderen Vorteile bietet.

Für die nicht reduzierten Proben wurde ein 5-%iges Gel, für die reduzierten ein 7,5-%iges benutzt.

Zur Herstellung der Gele wurden Glasröhrchen von 6 mm innerem Durchmesser und 70 mm Länge, die an beiden Seiten offen waren, benutzt. Sie wurden zuerst gesäubert, dann gründlich mit aqua dest. gespült und getrocknet. Anschließend wurden sie auf einer Seite mit einem Gummistopfen verschlossen und senkrecht aufgestellt, nachdem 1 cm unterhalb des oberen Randes eine Markierung angebracht worden war. Dann wurden in ein Glaskölbchen die Reagenzien zur Herstellung des Gels gegeben. Diese be-

standen für

5 %-ige Gele aus: 10 ml Gelpuffer
6 ml Lösung 8a
2 ml Lösung 9
12 ml Persulfatlösung 3a

Gelpuffer: 0,2 m Phosphatpuffer

1) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 7,8 g oder

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 8,8 g

2) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 25,6 g oder

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$: 51,5 g

aufgefüllt auf 1000 ml mit aqua bi-
dest., dem 2 g SDS beigegeben wurde.

Lösung 8a: Acrylamid: 25 g

Bis (Methylenbisacrylamid): 0,7 g

3 m Harnstoff : 18,0 g

ad 100 ml

Lösung 9a: Temed (N,N,N',N'-Tetramethyläthylen-
diamin: 0,23 ml auf 50 ml

Persulfatlösung 3a: Ammonium-Persulfat: 0,14 g

9 m Harnstoff: 54,0 g

ad 100 ml

7,5 %ige Gele wurden hergestellt, indem gleiche Mengen
zweier Lösungen A und B in ein Glaskölbchen gegeben und
gleichfalls gut gemischt wurden.

Lösung A: Acrylamid : 7,5 g und

Bis : 0,5 g werden in 25 ml 0,2 m
Phosphatpuffer (pH 7,2 ;wie oben beschrie-
ben) gelöst,

0,1 g SDS und

0,05 ml Temed zugegeben und mit aqua bi-
dest. ad 50 ml aufgefüllt.

Lösung B: 75 mg Ammoniumpersulfat werden in
50 ml 0,1 m Phosphatpuffer (pH 7,2;wie
oben beschrieben, aber 1:1 verdünnt)
gelöst.

Mit Hilfe einer 10 ml-Einmalspritze und einer Kanüle
Nr.1 werden nun die vorbereiteten Glasröhrchen ca.
1-2 cm aufgefüllt. Um eventuell vorhandene Luftbläschen

vom Grund zu entfernen, wurde vorsichtig von oben auf die Gläschen geklopft. Dann wurde weiter bis zur Markierung aufgefüllt. Zur Verhinderung einer Meniskusbildung am Oberrand des Gels und um die Polymerisation durch Verhinderung des Zutritts von Sauerstoff zu beschleunigen, wurde dann vorsichtig mit aqua dest. überschichtet. Dazu wurde eine Tuberkulinspritze mit einer sehr feinen Kanüle verwandt.

Zur schnelleren und vollständigeren Polymerisation wurden die Gele dann mindestens eine Stunde lang unter eine UV-Lampe gestellt.

Es wurde darauf geachtet, die Gelherstellung nach Mischen der Reagenzien möglichst schnell zu Ende zu bringen, um eine vorzeitige Polymerisation noch in den Kölbchen zu verhindern.

c) Herstellung des Laufpuffers

Als Laufpuffer wurden 2 l 0,1 m Phosphatpuffer (wie oben, 1:1 verdünnt), dem 2 g SDS zugegeben war, benutzt.

d) Beschreibung der Elektrophoresekammer

Die Kammer, in der gleichzeitig 14 Proben untersucht werden konnten, wurde von der Firma Desaga hergestellt. Sie bestand aus 2, je ca. 1000 ml fassenden Abteilungen, die voneinander durch eine von 14 Löchern durchbrochene Plexiglasscheibe getrennt waren und übereinander lagen. In die Löcher wurden die Glasröhrchen mit den polymerisierten Gelen eingeführt, nachdem die Gummistopfen vorsichtig entfernt worden waren, wobei darauf zu achten war, daß die Röhrchen auf beiden Seiten der Trennscheibe gleich weit hinausragten. Der obere Teil der Kammer wurde dann auf den unteren, der bereits mit ca. 900 ml Laufpuffer gefüllt war, aufgesetzt.

e) Auftragen und elektrophoretische Trennung der Proben

Bevor die Proben auf die Gele aufgetragen wurden,

mußte noch das aqua dest., das sich noch auf der Oberfläche des Gels befand, entfernt werden.

Die Auftragsmenge richtete sich nach dem $\Delta E_{280-325nm}$, d.h. der Konzentration der einzelnen Fraktionen. Zur Berechnung gab folgende, empirisch gefundene Formel Hinweise:
 $0,15 \times \Delta E_{280-325 nm} = \text{ml Auftragsmenge für nicht reduzierte, das ca. 1,5fache für reduzierte Proben. Aufgetragen wurde mit Mikropipetten, die auch zur anschließenden vorsichtigen Überschichtung mit frischem Laufpuffer dienten.}$

Dann wurde der obere Teil der Kammer bis ca. 3 cm über den Oberrand der Glasröhrchen mit Laufpuffer aufgefüllt, wobei darauf geachtet wurde, die Proben nicht in den Puffer aufwirbeln zu lassen, weshalb auch schon beim Einfüllen die Stromquelle eingeschaltet war. Bei einer Spannung von 60 V wurde eine Stromstärke von 60 mA (entspricht 4,3 mA/Gel) gemessen. Die nicht reduzierten Proben in 5 %igen Gelen liefen über 12 Stunden, die reduzierten in 7,5 %igen Gelen über 8 Stunden.

Der Laufpuffer wurde für 4 Elektrophoresen benutzt und dann neu zubereitet. Für reduzierte und nicht reduzierte Läufe wurden jeweils eigene Puffer verwandt, da der Puffer nach einem Lauf mit reduzierten Proben mit MCA verunreinigt war und so zu einer nicht gewünschten Reduzierung der Proben im nächsten Lauf geführt hätte.

Die Entnahme der Gele aus den Röhrchen war manchmal nicht ganz einfach, da darauf geachtet werden mußte, die Gele unbeschädigt zu erhalten. Mit einer Kanüle Nr. 1 wurde das Gel vorsichtig vom Glas gelöst, wobei dauernd aqua dest. durch die Kanüle gespritzt wurde. Eventuell wurde zur Entfernung der Gele noch in ein Ende des Glasröhrchen geblasen.

f) Färbung und Entfärbung der Gele

Nach Entnahme der Gele aus den Glasröhrchen wurden sie in einer Färbelösung von Coomassie-Brilliant-Blue

gefärbt. Diese Lösung wurde hergestellt aus
100 g Trichloressigsäure und
1,25 g Coomassie-Blue, mit aqua bidest.
ad 500 ml aufgefüllt und nach Lösung filtriert.

Die Färbedauer betrug, je nachdem, wie oft die Lösung schon benutzt worden war, zwischen 2 und 12 Stunden.

Entfärbt wurde dann mit 7 %iger Essigsäure. Zur beschleunigten Entfärbung wurde die Essigsäure mit den Gelen auf ca. 80° C erhitzt.

g) Dokumentation

Zur Dokumentation wurden die entfärbten Gele in kleine Glasröhrchen gesteckt und mit aqua dest. aufgefüllt. Dann wurden die Gläschen, meist 2-4 gleichzeitig, photographiert und in DIN A 4 - Heften nach laufender Nummer der Gelfiltration geordnet.

C. ERGEBNISSE

I. Beschreibung der Elektrophorese im Verlauf einer Gelfiltration bei Äthanoltest-negativem Plasma

I.1 Nicht reduzierte Fraktionen



Abb.6 :Elektrophorese nicht reduzierter (links) und reduzierter (rechts) Proben im Verlauf einer Gelfiltration bei Äthanoltest-negativem Plasma

Im Ausschlußvolumen (51 ml; siehe Abb.5) stellt sich außer einem Anteil, der direkt oben auf dem Gel geblieben war, nur ein äußerst geringer Anteil an Fibrinogenmaterial dar (auf Abb.6 kaum zu sehen), der, verglichen mit den Fibrinogenbanden aus dem Peak (93 ml) nur deren oberstem Anteil entspricht. In der Vorschulter (78 ml)

verschwindet das auf dem Gel gebliebene Material, die Fibrinogenbanden entwickeln sich, wobei die oberste dieser Banden sich vielleicht etwas stärker darstellt als die übrigen. Auffallend ist, daß sich die Fibrinogenbanden nicht als einziger Fleck oder Strich darstellen, sondern in meist 5 verschiedene Banden oder Komponenten aufgeteilt zu sein scheinen. Deren oberste erscheint dann noch am intensivsten angefärbt, etwas breiter und von den übrigen leicht abgesetzt. Im Peak erscheint dann noch eine schmale und sehr schwache Bande über der obersten, die auch im absteigendem Schenkel des Fibrinogenpeaks (105 ml) noch vorhanden ist. In dieser Fraktion erscheinen die Fibrinogenbanden bis auf die oberste untereinander leicht verwaschen, was auf eine gewisse Plasminaktivität schließen läßt.

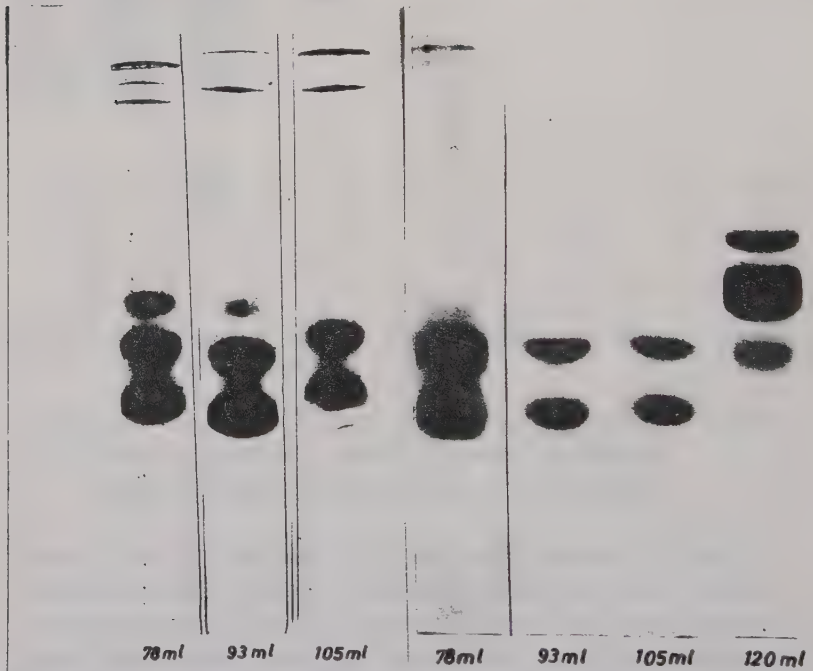


Abb.7 :Verminderte (links) und nicht darstellbare α -Ketten (rechts)

I.2 Reduzierte Fraktionen

Bei einem ersten Überblick fallen die 3 Banden in der Mitte der Gele auf. Es handelt sich dabei entsprechend den Molekulargewichten um, von oben nach unten, die α -, β - und γ -Kette des reduzierten Fibrinogenmoleküls.

a) Zur α -Kette

Zunächst muß auf technische Probleme bei der Darstellung der α -Kette eingegangen werden.

Es wurde die Erfahrung gemacht, daß die α -Kette bei Gelfiltration mit frischer Agarose immer klar und ausgeprägt auftrat. Nach mehrmaligem Gebrauch der Säule erschien dann die α -Kette vermindert, bis sie dann oft gar nicht mehr darstellbar war (Abb. 7).

Als Ursache dieser α -Kettenzerstörung, die unabhängig von der Art des Materials und nur abhängig vom Alter des verwendeten Agarosegels war, wurde zunächst angenommen, daß es sich um einen bakteriellen Abbau der α -Ketten handeln könnte. Es wurde deshalb eine Säule mit Antibiotikalösung gespült und anschließend eine Gelfiltration vorgenommen, die elektrophoretisch untersucht wurde, aber kein besseres Ergebnis zeigte. Da auch die Möglichkeit bestand, daß im Laufe der Zeit eine Anreicherung an α -Ketten-abbauenden Enzymen (v.a. Plasmin) erfolgte, wurde versucht, solche Enzyme durch Behandlung der Säule mit Harnstofflösung zu inaktivieren. Aber auch hiernach waren die Ergebnisse unbefriedigend.

Im allgemeinen verhält sich die α -Kette dahingehend, daß sie in der Vorschulter etwas schwächer als im Peak, allerdings etwas stärker als im absteigendem Schenkel des Peaks dargestellt wird. Dies bestätigt das oben angenommene Vorliegen von Plasminaktivität in diesem Teil der Filtration.

Beachtung für die Beurteilung der α -Kette dürfte

noch verdienen, daß im Albuminpeak (dem Peak, der in der Gelfiltration dem Fibrinogen folgt und der bei schlecht durchgeführter β -Ala-Fällung eine fast so hohe Extinktion erreichen kann wie der Fibrinogenpeak) eine Komponente erscheint, die in der Elektrophorese genauso weit wandert wie die α -Kette, ausgesprochen ausgeprägt ist und so leicht bei Beurteilungen der Elektrophoresen von Plasmafällungs-Rückständen zu Verwechslungen führen kann (Abb. 7 rechts, 120 ml). Diese Plasmafällungs-Rückstände sind überhaupt wegen der zahlreichen mitausgefallenen Plasmaproteine zur Beurteilung des Fibrinogens nur sehr beschränkt tauglich. Daß es sich im Albuminpeak nicht um Fibrinogen handelt, zeigt die Elektrophorese der nicht reduzierten Probe aus dieser Fraktion, wo eine Fibrinogenbande fehlt und nur eine sehr schwache, weiter als Fibrinogen gewanderte Bande zur Darstellung kommt.

Ein interessantes Phänomen ist, daß die α -Kette bei einigen Patientinnen als Doppelbande vorhanden ist. Wenn eine Doppelbande vorhanden ist, ist der obere Teil stärker ausgeprägt als der untere (Abb. 6). Möglicherweise handelt es sich hier um eine genetisch bedingte Variante.

In einigen Fällen liefen die α -Ketten im Vorschulterbereich anders als im Fibrinogenpeak (Abb. 8). Um herauszufinden, welche der Ketten sich anders verhielt, wurden die Verhältnisse der Laufstrecken der einzelnen Ketten zueinander verglichen. Dabei erhält man im Mittel von 9 Fällen folgende Werte:

	Peak	Vorschulter
α/β	0,815	0,815
α/γ	0,675	0,675
β/γ	0,825	0,815

Dabei variieren die Werte um $\pm 0,03$ um die Mittelwerte. Man sieht, daß sich im Vergleich von Vorschulter und Peak die Verhältnisse normalerweise kaum verändern. Im Beispiel der Patientin L.Z. betrugen die entsprechenden Werte:

	Peak	Vorschulter
α/β	0,79	0,685
α/γ	0,66	0,57
β/γ	0,83	0,83

Aus der Tatsache, daß allein der Wert β/γ sich nicht veränderte, mußte geschlossen werden, daß sich die α -Kette, da sie weniger weit gewandert war im Sinne eines höheren Molekulargewichtes verändert hatte. Daß die α -Kette grundsätzlich an dieser Bande beteiligt war, konnte man daraus entnehmen, daß sich in dem Maße, wie diese Bande im Verlauf der Gelfiltration verschwand, eine normale α -Kette entwickelte. Wahrscheinlich handelt es sich um ein α -Defekt-Polymer.

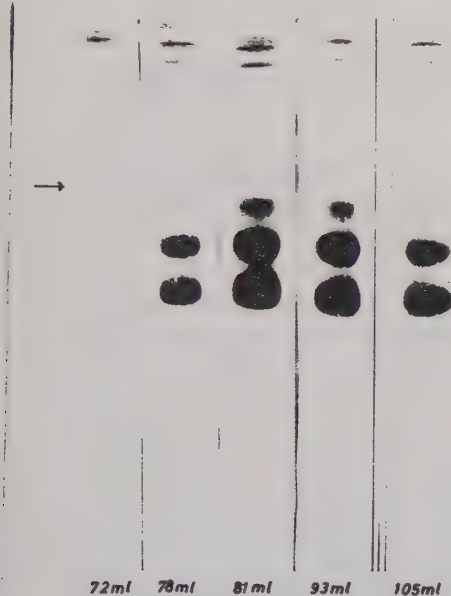


Abb.8: Elektrophorese mit langsamer als die α -Kette laufender Bande (→)

b) Zur β -Kette

Die β -Kette war immer ohne technische Schwierigkeiten gut darstellbar, meist war sie die am stärksten zur

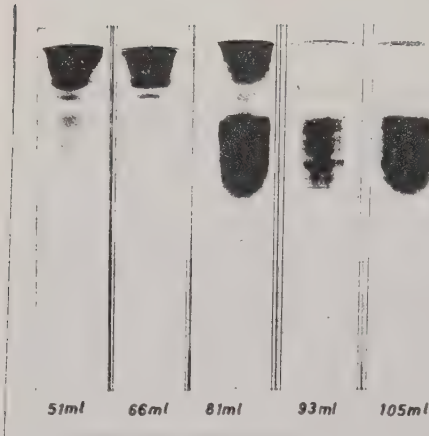


Abb.9:Elektrophorese der nicht reduzierten Fraktionen nach Gelfiltration bei Pat. A.G.

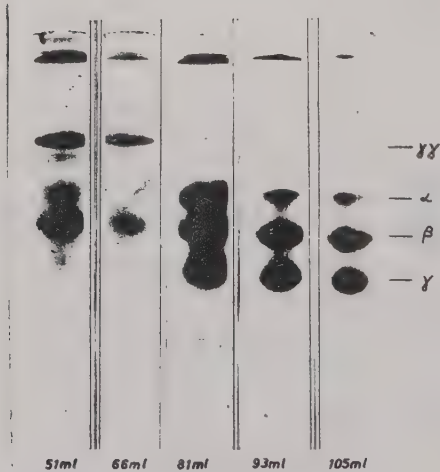


Abb.10:Elektrophorese der reduzierten Fraktionen nach Gelfiltration bei Pat. A.G.

Darstellung gekommene Bande. In keinem Fall konnte eine Vermehrung oder Verminderung im Laufe einer Gelfiltration festgestellt werden. Heterogenität wie bei der α -Kette trat nie auf.

c) Zur γ -Kette

Die γ -Kette war ebenfalls immer darstellbar, wenn auch meist schwächer als die β -Kette. Eine Verminderung trat nur in Verbindung mit dem Auftreten einer Bande auf, die sich in etwa der halben Strecke zwischen Auftragsstelle und γ -Kette befand und deshalb γ - γ -Dimeren entsprechen dürfte. Die genaue Beschreibung eines solchen Falles folgt unten.

d) Zu den übrigen, hochmolekularen, langsam laufenden Komponenten siehe unter II.4.

II. Fallbeschreibungen

II.1 Der Fall eines Reptilase-behandelten Dead-Fetus-Syndroms

a) klinischer Verlauf:

Die 28-jährige A.G. (2.para, 3.gravida) wurde am 23.11.74 in die I.Universitäts-Frauenklinik München eingeliefert. 6 Stunden vor der Aufnahme war eine Kürettage wegen einer "missed abortion" in der 21.Schwangerschaftswoche durchgeführt worden, die von starker vaginaler Blutung gefolgt war. Schwere Gerinnungsstörungen sowie Oligo- und Anurie stellten sich ein. Der Blutverlust betrug ca. 2000 ml. Die Patientin erhielt 1,1 ml Reptilase (= 1,1 Klobusitzky-Einheiten), außerdem 0,5 g AMCA (p-Amino-Methyl-Cyclohexancarbonsäure), 200000 KIE Aprotinin (Trasylol^R) und 1000 ml 0,9 %ige NaCl-Lösung, bevor sie in die I.UFK München kam.

Hier wurden ihr 20 ml Blut zur weiteren Untersuchung gemäß Abschnitt B.II entnommen, bevor ihr Blut-, Flüssigkeits- und Fibrinogenverlust ersetzt wurde. Das oligurische Stadium hielt weiter an, sodaß 6 Dialysen notwendig wurden.

Der weiter Verlauf war dann komplikationslos. Eine persistierende Nierenschädigung konnte auf Grund anschließender spezifischer Untersuchungen nicht festgestellt werden.

b) Befunde:

Die Fibrinogenbestimmung im Plasma ergab einen Wert von 98 mg%. Die Thrombozytenzahl betrug $38000/\text{mm}^3$, Hämatokrit 33 Vol%. Der Äthanoltest fiel (+++) aus.

Diese Werte in Verbindung mit dem akuten Nierenversagen legten bereits die Diagnose einer Verbrauchskoagulopathie mit disseminierter intravaskulärer Gerinnung nahe (27).

Diese Diagnose sollte durch weitere Laboruntersuchungen bestätigt werden und Rückschlüsse auf eventuelle Quervernetzungen gezogen werden. Die Agarose-Gelfiltration brachte folgendes Bild (Abb.11):

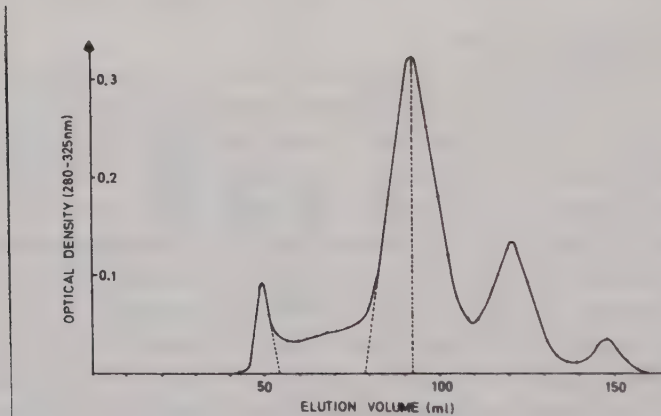


Abb.11 :Optische Dichte in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen nach Agarose-Gelfiltration bei Pat.A.G.

Ein erster Peak erschien mit dem Ausschlußvolumen bei 48 ml, dem eine Schulter von 55-80 ml folgte. An diese Vorschulter schloß sich der Fibrinogenpeak bei 92 ml an. Ihm folgte der Albuminpeak bei 120 ml.

Die planimetrische Auswertung ergab, daß vor dem Fibrinogenpeak bereits 25 % des gesamten Fibrin-Fibrinogen-Materials eluiert worden war, 6,3 % im Ausschlußvolumen von 45 - 53 ml.

Die gesammelten und mit 5 m Harnstoff gesättigten Fraktionen wurden daraufhin einer SDS-PAA-Disk-Elektrophorese unterzogen.

Die nicht reduzierten Proben aus Ausschlußvolumen und Vorschulter (s. Abb. 9; 51 und 66 ml) zeigten kein Material, welches gleich weit wie Fibrinogen gewandert war. Auffallend dagegen, daß sehr viel Material an der Oberfläche des Gels verblieb und/oder sehr wenig in das Gel einwanderte. In der ersten Fraktion des aufsteigenden Schenkels des Fibrinogenpeaks war dieses Material zwar auch noch vorhanden, zusätzlich traten jetzt aber auch Fibrinogenbanden auf (81 ml), wobei von diesen deren oberste besonders stark ausfiel. Im Peak selbst war hochmolekulares Material nicht mehr nachweisbar, nur noch Fibrinogenbanden verblieben (93 ml).

Die Proben aus den einzelnen Fraktionen wurden auch im reduzierten Zustand einer Elektrophorese unterzogen (Abb. 10).

Dabei zeigte sich in Ausschlußvolumen und Vorschulter (51 und 66 ml) neben α -, β - und γ -Ketten noch eine Doppelbande, die etwa auf der halben Strecke zwischen Oberfläche des Gels und γ -Kette lag. Außerdem war die γ -Kette im Vergleich zur β -Kette stark vermindert. Daraus mußte der Schluß gezogen werden, daß es sich bei der langsamer laufenden Bande um γ - γ -Dimere handeln mußte, die im Gegensatz zu den LFMK in 5 m Harnstofflösung nicht mehr dissoziierbar waren. Es mußte also unter Einfluß von Faktor XIII (FSF) zu einer kovalenten Bindung zwischen den Fibrin-Monomer-Komplexen gekommen sein, die dann entsprechend ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit und ihrem Erscheinen im Ausschlußvolumen ein Molekulargewicht von 2×10^6 und mehr haben mußten. In Spuren waren die γ - γ -Dimeren auch im aufsteigendem

Schenkel noch nachweisbar (81 ml).

Entsprechend den Versuchen von Ly et al. (38) wurde daraufhin Plasma einer gesunden, Äthanoltest-negativen Frau mit Thrombin und Ca^{++} versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Das entstandene Gerinnsel wurde dann mehrmals sorgfältig in physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und anschließend in Harnstoff und MCA gelöst. Lösung allein in Harnstoff war nicht möglich. Das wiederaufgelöste Gerinnsel wurde dann direkt elektro-phoretisch untersucht (Abb. 12).



Abb. 12: In-vitro-Aktivierung von Faktor XIII im Plasma

Es zeigte sich eine starke β -Kette, eine schwache α -Kette (in diesem Fall als Doppelbande) und eine starke γ - γ -Dimerbande. Bei dieser Untersuchung war die γ -Kette nicht nur vermindert, sondern völlig verschwunden, was auf einen totalen Verbrauch zur Bildung der Dimeren deutet, im Gegensatz zum Fall der Pat. A.G., wo dieser Umsatz nur inkomplett verlaufen war. Außerdem blieb noch Material an der Oberfläche des Gels zurück, was entweder auf Bildung noch höhermolekularerer Oligomere der γ -Kette und/oder, wegen der α -Kettenverminderung auf α -Polymere schließen lassen kann. Letzteres wäre nicht unwahrscheinlich, da bei Elektrophoresen des Fibrinogens direkt aus

dem Plasma unter Vermeidung einer Gelfiltration nie eine α -Kettenverminderung festgestellt wurde. Zu diskutieren wäre auch ein Plasmin-induzierter α -Kettenabbau.

Die α -Kette im Falle der Pat.A.G. war in den Proben aus dem Ausschlussvolumen stark, in der Vorschulter besonders stark vermindert und nahm im aufsteigendem Schenkel des Peak und dort selbst zu, war aber auch hier noch leicht vermindert, was einen zumindest teilweisen Plasminabbau wahrscheinlich macht.

Bei der Bande, die in ca. 0,5 cm von der Geloberfläche auftrat könnte es sich, da sie in allen Fraktionen gleich stark auftrat, um Material handeln, das sich bei der Gelfiltration an Fibrin-/Fibrinogenmaterial anhängt und so mit diesem gemeinsam eluiert wird (fibrinogen-associated-proteins). Es könnten auch in der Kälte ausfallende Globuline (Cryoglobuline) sein. Diese Bande war vor allem bei Tumorpatienten regelmäßig vorhanden und wird dort noch beschrieben.

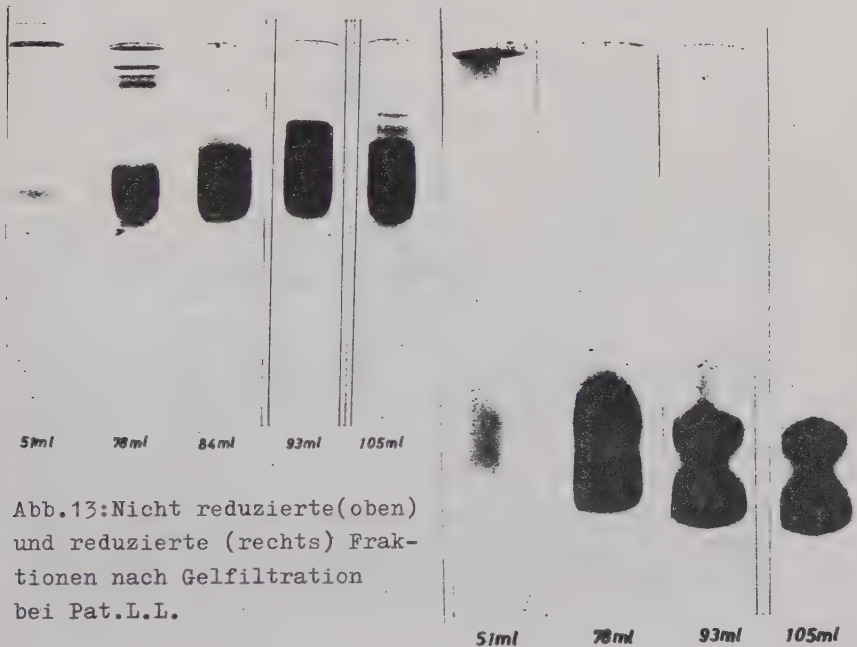


Abb.13:Nicht reduzierte (oben) und reduzierte (rechts) Fraktionen nach Gelfiltration bei Pat.L.L.

II.2 Der Fall einer Urosepsis ohne klinische Schockzeichen

Die Patientin L.L. befand sich in der 37. Schwangerschaftswoche, als sie eine Urosepsis entwickelte. Von ihr wurden 10 ml Blut entnommen und untersucht.

Die Laborwerte waren: Hämatokrit 31 Vol%; Thrombozyten $93000/\text{mm}^3$; Fibrinogen im Plasma 912 mg%.

Der niedrige Thrombozytenwert bei extrem hoher Fibrinogenkonzentration spricht für eine drohende Verbrauchskoagulopathie. Eine disseminierte intravaskuläre Gerinnung braucht dabei noch nicht vorzuliegen, die LFMK aber müssen auf jeden Fall vermehrt nachweisbar sein.

Die photometrische Auswertung der Gelfiltration ergab folgendes Bild:

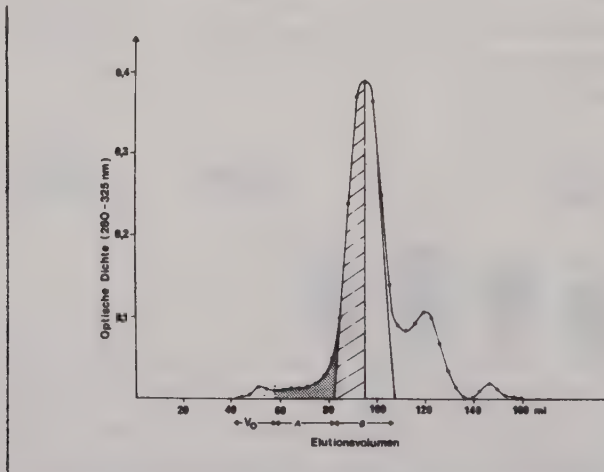


Abb.14: Optische Dichte in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen nach Agarose-Gelfiltration bei Pat. L.L.

Der gegenüber der Norm mit 6,4% = 58 mg% erhöhte Anteil an Fibrin-Fibrinogen-Material, der vor dem Fibrinogenpeak eluiert wurde, aber nicht ein Ausmaß erreichte wie im oben beschriebenen Fall der Pat. A.G. sowie der

(+++) ausgefallene Äthanoltest rechtfertigte die Annahme einer drohenden Verbrauchskoagulopathie mit intravaskulärer Gerinnung.

Bei der elektrophoretischen Untersuchung zeigte sich bei den nicht reduzierten Proben (Abb.13) aus dem Ausschlußvolumen (51 ml) eine schwache Bande in Höhe des unteren Randes der Fibrinogenbanden. Diese Bande wurde in der Vorschulter etwas breiter (78 ml), bis sie im aufsteigendem Schenkel des Fibrinogenpeaks (84 ml) ihre normale Breite zeigte. Auffallend vielleicht auch im Vergleich zu oben beschriebener, Äthanoltest-negativer Probe, daß hier der untere Teil der Fibrinogenbanden stärker ausgeprägt war als der obere.

Alle diese Befunde lassen auf eine erhöhte Plasminaktivität schliessen.

Zusätzlich zu den Fibrinogenbanden fand sich im Ausschlußvolumen und in der Vorschulter noch die auch oben beschriebene Bande, die ganz oben auf dem Gel liegen blieb, in der Vorschulter aber auch noch etwas weiter gewandertes Material, welches sich ähnlich den hochmolekularen Derivaten verhielt, wenn auch nicht so ausgeprägt, wie im Fall der Pat.A.G.

Im Gegensatz hierzu waren in den reduzierten Proben (Abb.13) der entsprechenden Fraktionen keine γ - γ -Dimeren als Ausdruck einer Quervernetzung durch Faktor XIII nachweisbar. Gefunden wurde dagegen im Ausschlußvolumen eine Bande, die am Oberrand des Gels blieb. Es könnte sich wegen der verminderten α -Kette um α -Polymere, aber auch einfach nur um Verunreinigungen handeln.

In Ausschlußvolumen und Vorschulter fehlte eine α -Kette. Sie trat zum Peak hin stärker auf, war aber auch dort noch vermindert. Die Agarose-Gelfiltration wurde hier übrigens an einer schon mehrere Monate gebrauchten Säule durchgeführt.

β - und γ -Ketten waren im Ausschlußvolumen nur sehr schwach und verwaschen vorhanden. Auch in der Vorschulter gingen die beiden Banden ineinander über und waren

erst im Peak deutlich voneinander getrennt.

Die relative α -Kettenverminderung sowie die abgebauten Fibrinogenbanden in den nicht reduzierten Proben lassen auf Plasminaktivität in vivo schließen, Zeichen der stattfindenden Hyperfibrinolyse.

II.3 Der Fall eines beginnenden Endotoxinschocks bei septischem Abort

Der Fall der Pat.v.G. gibt ein gutes Beispiel für die manchmal auftretenden Schwierigkeiten bei den Untersuchungen.

Die Patientin wurde unter den klinischen Anzeichen eines infizierten Abortes in der 16.Schwangerschaftswoche in die I.UFK München eingeliefert. Sie befand sich im beginnendem Schock mit hohem Fieber, Nierenversagen und Gerinnungsstörungen. Ihr wurde daraufhin vor einer weiteren Therapie Blut für die Laboruntersuchungen abgenommen.

Der Äthanoltest fiel (+++) aus. Die Fibrinogenkonzentration im Plasma war mit 237 mg% leicht erniedrigt, wenn man bedenkt, daß physiologischerweise die Fibrinogenkonzentration in der 16.SSW zumindest ca. 260 mg% beträgt.

Bei der Gelfiltration (nahezu gleicher Kurvenverlauf wie Abb.14) wurden 6,73% des Gesamtfibrinogens vor dem Fibrinogenpeak eluiert, was einem absolutem Gehalt von 16 mg% entspricht.

Die Elektrophoresen der nicht reduzierten Proben ergaben folgendes Bild (Abb.15):

In Ausschlußvolumen (51 ml) und Vorschulter (78 ml) blieb wie üblich Material direkt an der Geloberfläche hängen. Weitere Komponenten waren nur wenig in das Gel eingewandert. Diese hochmolekularen Derivate waren in der Vorschulter am stärksten ausgeprägt und noch in der ersten Fraktion des aufsteigenden Schenkels (84 ml), wenn auch schwächer, zu finden. Die Fibrinogenbanden wa-

ren im Ausschlußvolumen nicht, in der Vorschulter nur im unteren Teil, verglichen mit den Banden aus dem Peak vorhanden. Auffallend, daß sie auch im Peak noch sehr verwaschen erschienen.

Auf Grund der in der Vorschulter aufgetretenen, hochmolekularen Derivate, die langsamer als Fibrinogen wanderten, wurde nun, analog zu den Ergebnissen im Falle der Pat.A.G. das Auftreten von γ - γ -Dimeren in den entsprechenden Fraktionen nach Reduktion erwartet. Bei Betrachtung der Elektrophoresen der reduzierten Fraktionen (Abb.16) aus dem Peak (93 ml) erschienen zunächst β - und γ -Ketten sehr verwaschen und schwer differenzierbar. Eine α -Kette fehlte. In der Vorschulter (78 ml) und der ersten Fraktion des aufsteigenden Schenkels (84 ml) waren die beiden Banden überhaupt nicht mehr auseinanderzuhalten. Eine den γ - γ -Dimeren entsprechende Bande konnte nicht gefunden werden. Vom Oberrand des Gels aus der Vorschulter bis zum β - γ -Fleck zog sich ein Schleier, der ganz oben etwas verstärkt war.

Zusätzlich zeigte sich in den Fraktionen aus Ausschlußvolumen (hier am stärksten), Vorschulter und erster Fraktion des aufsteigenden Schenkels (hier nur noch ganz schwach) eine Komponente, die etwa doppelt so weit gelaufen war wie die γ -Kette. Wegen der verwaschenen β - und γ -Ketten und des Auftretens dieser Komponenten wurde der Schluß gezogen, daß eine erhöhte Plasminaktivität stattgefunden haben mußte. Auch das Fehlen der γ - γ -Dimeren konnte nicht anders erklärt werden.

Es muß noch hinzugefügt werden, daß wegen technischer Mängel in der automatischen Zeituhr die Elektrophorese statt 8 Stunden nur über etwa 6 Stunden lief und so β - und γ -Kette dichter beieinander lagen als sonst üblich.

Zur Überprüfung wurde deshalb 4 Tage später ein weiterer Elektrophoresenlauf mit demselben Material durchgeführt. Diesmal betrug die Laufzeit 8 Stunden, wobei nur die reduzierten Proben noch einmal überprüft wurden (Abb.17).

Im Ausschlußvolumen (51 ml) erschien nur eine sehr schwache Bande, die nur sehr wenig in das Gel eingewandert war. Im Peak fehlte wieder die α -Kette, β - und γ -Kette waren diesmal deutlich getrennt, erschienen aber nicht so scharf wie sonst üblich und waren durch einen dünnen Schleier miteinander verbunden. In der Vorschulter (78 ml) und der ersten Fraktion des aufsteigenden Schenkels (84 ml) waren β - und γ -Ketten auch diesmal nicht zu differenzieren. Dafür fand sich diesmal, wenn auch nur sehr schwach, eine Bande, die etwas langsamer als die α -Kette wanderte und so oben schon als α -Defekt-Polymer beschrieben wurde. Außerdem zeigte sich eine Bande, die ca. halb so weit wanderte wie der untere Teil des β - γ -Flecks und einen, wenn auch schwachen Hinweis auf das Vorliegen von γ - γ -Dimeren als Ausdruck stattgefundener Faktor-XIII-Aktivität gab. Eine γ -Kettenverminderung konnte wegen der verschwommenen Banden nicht festgestellt werden, wäre aber auch in größerem Umfange nicht zu erwarten gewesen.

Auffallend wiederum der Schleier, der sich zum Oberand des Gels hinzog und dort eine stärker erscheinende Bande bildete.

Die weiter als die γ -Kette gewanderten Komponenten waren diesmal nicht zu sehen und wahrscheinlich unten aus dem Gel gelaufen.

Zur Vervollständigung der Untersuchungen wurde noch eine Elektrophorese des β -Ala-Rückstandes (s.S.12) durchgeführt (Abb.18). Hier zeigte sich in der nicht reduzierten Probe neben den Fibrinogenbanden, die nicht so verwaschen waren wie in den Proben nach Gelfiltration und deren oberer Teil stärker war als der untere, hochmolekulare Derivate, die wenig in das Gel eingewandert waren. Sie entsprach also in etwa der nicht reduzierten Fraktion aus der Vorschulter nach Gelfiltration, mit dem Unterschied, daß diesmal keine Plasminaktivierung stattgefunden hatte. Dies läßt sich auch daraus schließen, daß in der Elektrophorese des β -Ala-Rückstandes nach Reduk-

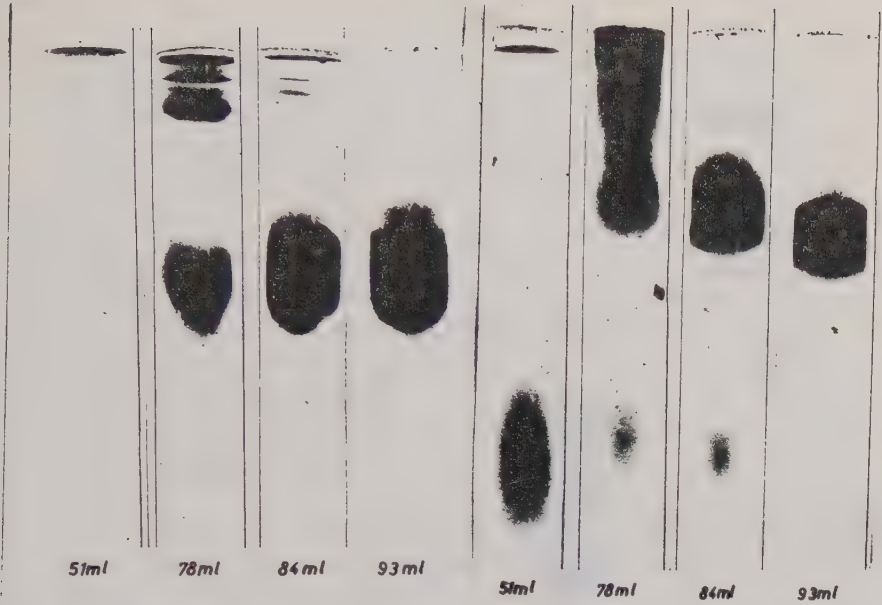


Abb.15 (links oben):Nicht reduzierte Fraktionen,

Abb.16 (oben):Erster Elektrophoresenlauf der reduzierten Fraktionen und

Abb.17 (links):Wiederholungslauf der reduzierten Fraktionen nach Gelfiltration bei Pat.v.G.



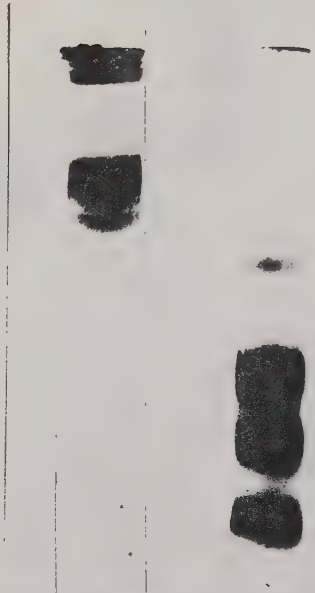


Abb.18 (links):Elektrophorese des β -Ala-Rückstandes (links nicht reduziert, rechts reduziert) von Pat.v.G.

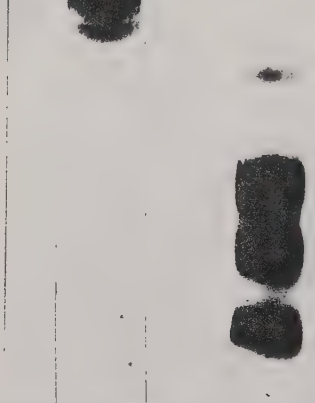


Abb.19 (links unten): Nicht reduzierte Fraktionen und

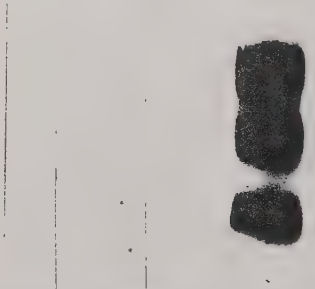
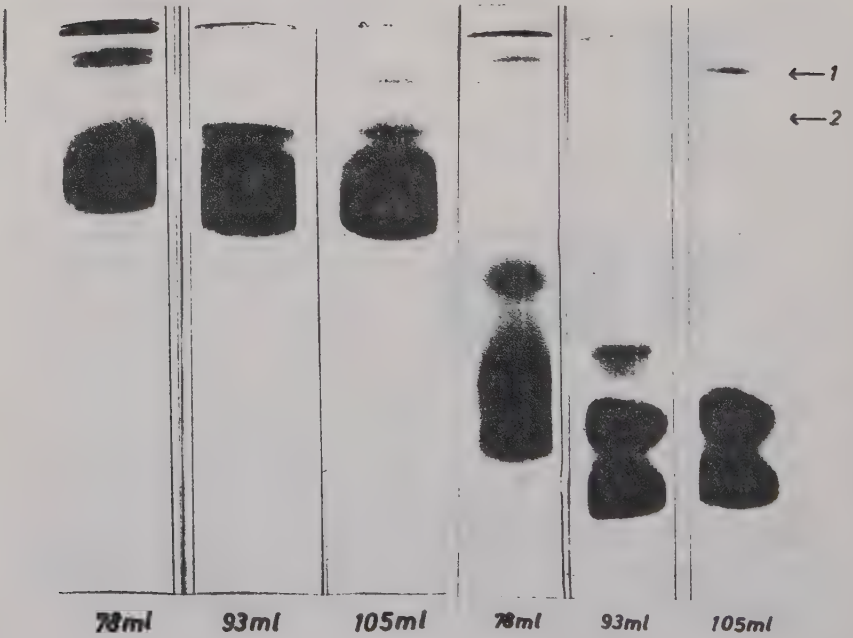


Abb.20 (unten):reduzierte Fraktionen nach Gelfiltration bei Pat.B.O.



tion eine starke Bande in Höhe der α -Kette vorhanden war, die sogar leicht ausgeprägter war als die β -Kette. Es muß hier allerdings angenommen werden, daß sich in der Probe wahrscheinlich auch Komponenten befanden, die bei der Gelfiltration im 2. Peak erscheinen und, wie oben beschrieben, eine verstärkte α -Kette vortäuschen können. Die γ -Kette war gegenüber der β -Kette leicht vermindert darstellbar. Zusätzlich zu den 3 Fibrinogenbanden erschien aber jetzt im β -Ala-Rückstand eine im Vergleich zu den anderen zwar schwache, aber doch deutliche Bande, die γ - γ -Dimeren entsprach.

II.4 Tumorpatientinnen

Von den untersuchten Patientinnen, die wegen eines gynäkologischen Tumors in die Klinik kamen, mag die Patientin B.O. als Beispiel dienen.

Die interessierenden Laborbefunde waren: Thrombozyten $143000/\text{mm}^3$; Fibrinogen im Plasma 519 mg%. Der Gehalt von LFMK am Gesamtfibrinogen betrug 3,77 %, was einem absolutem Gehalt von 19,55 mg% entspricht. Der Äthanoltest fiel (+) aus. Es ist zu fragen, ob dies nicht z.T. durch die Fibrinogenkonzentration bedingt war, da der relative LFMK-Gehalt normal war. Fibrinogen ist nach größeren Operationen (in diesem Falle wegen eines Ovarial-Carcinoms) immer erhöht.

Die Elektrophorese der nicht reduzierten Proben (Abb. 19) zeigte in der Vorschulter (78 ml) wieder hochmolekulares Material, das direkt an der Geloberfläche liegen blieb, 2 feine Banden, die etwas weiter in das Gel eindringen und die Fibrinogenbanden, die als einheitlicher Fleck erschienen und insgesamt etwas schmaler waren als die Banden im Peak (93 ml). Die 2 feinen Banden und das oben gebliebene Material waren im weiteren Verlauf der Gelfiltration nicht mehr nachweisbar. Die Fibrinogenbanden waren dort differenzierbar und erschienen wegen zu großer Auftragsmenge leicht ineinander

übergehend. Alle waren gleich stark ausgebildet; nur im absteigendem Schenkel des Fibrinogenpeaks (105 ml) war der obere Anteil etwas vermindert.

Nach Reduktion der Proben (Abb. 20) waren β - und γ -Ketten in sämtlichen Fraktionen jeweils gleich stark vertreten. Die α -Kette, in diesem Falle als Doppelkette, war in der Vorschulter kaum nachweisbar (78 ml), erschien dann im aufsteigendem Schenkel, erreichte im Peak ein Maximum und war im absteigendem Schenkel wieder stark vermindert. Auffallend wieder in der Vorschulter eine Bande, die etwas langsamer als die α -Kette wanderte und in dem Maße an Intensität abnahm, wie die α -Kette zunahm, bis sie kurz vor dem Peak nicht mehr in Erscheinung trat und, wie schon oben gesagt, als α -Defekt-Polymer gedeutet wurde.

Als Besonderheit bei den Tumorpatientinnen zeigte sich in sämtlichen, elektrophoretisch untersuchten Fällen in allen Fraktionen 2 Banden, die etwa $1/4$ (Abb. 20; $\rightarrow 2$) bzw. $1/8$ ($\rightarrow 1$) der Strecke, die die α -Kette zurückgelegt hatte, in das Gel eindringen. Es könnte sich also, nachdem die α -Kette in allen Fraktionen vermindert war, um Tetra- bzw. Oktomere der α -Kette handeln. Ungewöhnlich an dieser Vorstellung ist, daß sie wegen ihres hohen Molekulargewichtes nicht ausschließlich im Aus-schlußvolumen erscheinen. Diskutiert wurde auch, ob man es nicht mit in der Kälte präzipitierbarem Material (Cryoglobuline) zu tun habe. Bekanntlich sind Cryoglobuline bei Tumorpatienten oft vermehrt nachweisbar.

II.5 Kaninchen unter Endotoxininfusion

In Anlehnung an frühere Arbeiten von Graeff (43, 44) wurde schwangeren Kaninchen 30-50 $\mu\text{g/kg/h}$ über 6-14 Stunden Escherichia coli-Endotoxin infundiert, in der Absicht, ein dem Endotoxinschock des Menschen ähnliches Bild zu erhalten.

Die im Anschluß durchgeführten Untersuchungen boten

folgendes, typisches Bild: Thrombozytenzahl und Fibrinogenkonzentration im Plasma waren vermindert; in der Agarose-Gelfiltration wurde bereits vor dem Fibrinogen ein großer Anteil an hochmolekularem Fibrinogen-Fibrin-Material eluiert.

Die Elektrophoresen der einzelnen Fraktionen verhielten sich ähnlich wie im oben beschriebenen Fall der Pat. A.G.: In den nicht reduzierten Fraktionen Auftreten von höhermolekularen Derivaten in Ausschlußvolumen und Vorschulter, die in 5 m Harnstofflösung nicht mehr löslich waren, Fibrinogenbanden erst ab dem aufsteigendem Schenkel des Fibrinogenpeaks; nach Reduktion α - und γ -Kettenverminderung in Ausschlußvolumen und Vorschulter, Auftreten von kovalent quervernetzten γ - γ -Dimeren als Ausdruck der Faktor XIII-Aktivität.

Die histologische Untersuchung zeigte Fibrinniederschläge in den Glomerulaschlingen der Nierenrinde und in den Kapillaren anderer Organe.

D. DISKUSSION

Die erste Fragestellung dieser Arbeit, ob eine SDS-PAA-Disk-Elektrophorese nach Gelfiltration von Einzelproben β -Alanin-gefällten Fibrinogen-Fibrin-Materials möglich sei, kann von den Ergebnissen her bejaht werden.

Es wurden zunächst Plasmaproben beschrieben, die einen negativen Äthanoltest aufwiesen. Dabei wurde festgestellt, daß die nicht reduzierten Fraktionen der Gelfiltration im Ausschlußvolumen kaum Fibrinogenmaterial enthielten, ab der Vorschulter bis in den absteigenden Schenkel Fibrinogen darstellbar war, das sich in mehrere Banden aufsplitterte, die unterschiedlich stark anfärbbar waren. Nach Reduktion der Disulfidbrücken kamen die 3 Untereinheiten des Fibrinogenmoleküls, nämlich die α -, β - und γ -Ketten zur Darstellung.

Es wurde auf technische Schwierigkeiten bei der Darstellung der α -Kette, die vor allem vom Alter des zur Agarose-Gelfiltration verwandten Agarosegels abhängig waren und dem Versuch ihrer Beseitigung hingewiesen.

In einigen Fällen, vor allem bei Äthanoltest-positiven Fällen, war die α -Kette in der Vorschulter etwas schwächer als im Peak, was auf Plasminaktivität zurückgeführt wurde. Eine (u.U. genetisch bedingte?) Heterogenität der α -Kette, die sich in manchmal auftretenden Doppelbanden manifestierte, wurde festgestellt. In einigen Fällen wurde in der Vorschulter eine Bande gefunden, die etwas langsamer lief als die α -Kette. In diesen Fällen war die α -Kette dann mehr als normal vermindert. Es wurde das Vorliegen von α -Defekt-Polymeren angenommen, die ein Molekulargewicht von etwa $80-85 \times 10^3$ besitzen müßten. Zur Beurteilung von Plasmafällungs-Rückständen wurde auf Material verwiesen, das im Albuminpeak erscheint, nach Reduktion gleich weit läuft wie die α -Kette und sehr stark anfärbbar ist.

Betreffs der β -Kette wurden keine Besonderheiten festgestellt.

Auch die γ -Kette veränderte sich bei den Äthanol-test-negativen Plasmen im Verlauf der Gelfiltration nie.

Bei den Fallbeschreibungen wurde zunächst eine Patientin vorgestellt, bei der nach einem dead-fetus-Syndrom starke Blutungen, Gerinnungsstörungen und akutes Nierenversagen festgestellt wurde und die u.a. mit Reptilase behandelt worden war.

Thrombozytenzahl und Fibrinogenkonzentration im Plasma waren stark abgefallen. Fibrinogenderivate mit höherem Molekulargewicht als Fibrinogen selbst machten ein Viertel des gesamten Fibrinogengehaltes aus. Diese Derivate waren im Gegensatz zu den ~~UFMK~~ β - β -FMK, die während einer normalen Schwangerschaft auftreten, in Harnstoff und SDS nicht mehr löslich. Solche Derivate waren auch bei einem Fall mit abruptio placentae und bei asphyktischen Neugeborenen in Verbindung mit disseminierter intravaskulärer Gerinnung gesehen worden (21, 18). Durch die SDS-PAA-Disk-Elektrophorese konnten auch Rückschlüsse auf die Art der intramolekularen Quervernetzungen dieser Derivate gezogen werden.

Im Ausschlußvolumen und Vorschulter zeigte sich vor Reduktion nur wenig monomeres Fibrin oder Fibrinogen. Der größte Teil war im Gel nicht weit gewandert und in SDS und Harnstoff also nicht löslich. Sein Molekulargewicht wurde auf 2×10^6 und mehr geschätzt.

Die Kettenanalyse nach Reduktion zeigte γ - γ -Dimere als Folge von Faktor XIII-Einwirkung, die zur kovalenten Bindung zwischen den Fibrin-Monomeren führte.

In Anlehnung an Ly et al. wurde ein in vitro-Ver-such mit Faktor XIII-Aktivierung durchgeführt, der das gleiche Ergebnis zeigte. Die γ -Kette war infolge der Monomer-Dimer-Umwandlung vermindert, ebenso die α -Kette, was entweder auf Bildung von α -Polymeren oder auf Plasminaktivität zurückgeführt wurde.

Das Zusammentreffen von kovalent gebundenen, hochmolekularen Fibrinogenderivaten und niederer Fibrinogenkonzentration und Thrombozytenzahl scheinen das Vorlie-

gen einer disseminierter intravaskulärer Gerinnung anzuzeigen.

Ähnliche Derivate wurden auch im Experiment bei Kaninchen gefunden, bei denen ein generalisiertes Sanarelli-Schwartzman-Phänomen induziert worden war.

Es bleibt die Frage offen, ob diese Derivate durch Auflösung der intravaskulären Gerinnsel oder im zirkulierenden Blut entstanden. Weiterhin ist der Einfluß von Reptilase auf die DIG nicht leicht zu beurteilen. Einerseits wurde gezeigt, daß Reptilase in vitro zu Gerinnseln führt, wahrscheinlich über die Aktivierung von Faktor XIII (41), andererseits führten Harder und Straub Versuche am Menschen durch, bei denen allerdings das 5-fache der Menge injiziert wurde, die die Pat. A.G. erhielt, der Fibrinogenabfall nur 20 % des Anfangswertes betrug und LFMK vermehrt nachgewiesen wurden (42). Reptilase dürfte in jedem Fall beim Vorliegen einer DIG kontraindiziert sein.

Als nächstes wurde der Fall einer Patientin mit Urosepsis ohne klinische Anzeichen eines Schocks dargestellt. Auf Grund der niedrigen Thrombozytenzahl und der extrem hohen Fibrinogenkonzentration im Plasma wurde eine drohende Verbrauchskoagulopathie angenommen.

Zum Verständnis trägt das sogenannte "Sanarelli-Schwartzman-Phänomen" bei. Injiziert man Kaninchen Endotoxine, z.B. aus *E.coli*, kommt es bei diesen Tieren zu einem Zustand der Hyperkoagulabilität, ohne daß eine Verbrauchskoagulopathie voll ausgelöst wird. Es lassen sich dabei histologisch Mikrothrombosierungen in der Peripherie nachweisen. Zwischenprodukte der Gerinnung wie Fibrinmonomere werden dabei durch das retikuloendotheliale System (RES) der Leber und Milz eliminiert, zusätzlich kommt es zu einer Hyperfibrinolyse und einer reaktiven, überschießenden Fibrinogensynthese.

Wird jetzt eine zweite Endotoxininjektion vorgenommen, vermag das RES die zusätzlich entstehenden Fibrinogenderivate nicht mehr abzubauen, es kommt zur intravas-

kulären Gerinnung. Die Fibrinogensynthese kann dann mit dem Fibrinogenverbrauch nicht mehr Schritt halten und seine Konzentration im Plasma sinkt u.U. bis auf den Nullpunkt ab. Man spricht dabei von Defibrinisierung (39).

Eine drohende Verbrauchskoagulopathie müßte also durch Hyperfibrinolyse (=erhöhte Plasminaktivität), vermehrtes Auftreten von Fibrinogenderivaten, die aber noch löslich sein können und überschießender reaktiver Fibrinogensynthese gekennzeichnet sein. All dies konnte nachgewiesen werden.

Fibrinogen war mit 912 mg% extrem hoch; 6,4 % des Gesamtfibrinogengehaltes wurde bei der Gelfiltration vor dem Fibrinogen eluiert. Die erhöhte Plasminaktivität ließ sich in der Elektrophorese nachweisen durch:

- 1) abgebautes Fibrinogen in Ausschlußvolumen und Vorschulter,
- 2) im Peak war der untere Teil der Fibrinogenbanden stärker als der obere (normalerweise umgekehrt),
- 3) nach Reduktion verwaschene β - und γ -Ketten und
- 4) relative α -Kettenverminderung in der Vorschulter.

In Harnstoff und SDS nicht lösliche Derivate konnten zwar in Spuren gezeigt werden, γ - γ -Dimere aber waren nicht nachweisbar.

Der dritte Fall zeigte einen Endotoxinschock nach septischem Abort. Die klinischen Erscheinungen wiesen zweifelsohne auf das Vorliegen einer DIG hin. Sie auf molekularer Ebene nachzuweisen war aber in diesem Falle schwierig und gelang nur nach Überwindung gewisser technischer Probleme.

Auch diesmal wurden in der Gelfiltration wieder vermehrt hochmolekulare Fibrinogenderivate vor dem Fibrinogen eluiert, wenn auch nicht in gleichem Maße wie bei der Pat. A.G. Bei der elektrophoretischen Untersuchung zeigte sich, daß auch dieses Material in Harnstoff und SDS nicht löslich war. Nach Reduktion der Disulfidbrücken konnten dann aber kovalent quervernetzte γ - γ -Dimere erst im zweiten Versuch und dann auch nur in Spuren

nachgewiesen werden. Eindeutiger gelang dies bei der Elektrophorese des reduzierten β -Ala-Rückstandes. Da eine in vitro-Aktivierung von Faktor XIII im β -Ala-Rückstand wegen der genügend hohen Konzentration an Antikoagulantien bei der Blutentnahme ausgeschlossen werden konnte, mußte eine gewisse Plasminaktivität im Laufe der Gelfiltration angenommen werden, die für das Fehlen bzw. nur schwache Auftreten der γ - γ -Dimere verantwortlich gemacht wurde. Weitere Indizien dafür waren auch das abgebaute Fibrinogen in der Vorschulter sowie verwaschene Fibrinogenbanden im Peak bei den nicht reduzierten Proben, nach Reduktion das Fehlen einer α -Kette selbst im Peak, die ineinander übergehenden β - und γ -Ketten sowie das Auftreten von Abbauprodukten (Fragment X ?) in Ausschlußvolumen und Vorschulter, die doppelt soweit gelaufen waren wie die γ -Kette. Alle diese Erscheinungen können nicht mit der "normalen" in vivo-Hyperfibrinolyse bei DIG erklärt werden, da sonst sicherlich die Fibrinogenkonzentration im Plasma niedriger gewesen wäre.

Da Tumorpatientinnen in früheren Untersuchungen eine erhöhte Gerinnungsbereitschaft (Hyperkoagulabilität) aufwiesen (22,28), wurden auch hier weitergehende Untersuchungen angestellt. Im Beispiel lag der LFMK-Gehalt am oberen Rand der Norm. Es konnten keine, in Harnstoff und SDS nicht lösliche Fibrinogenderivate festgestellt werden. Erwartungsgemäß waren dann auch keine γ - γ -Dimeren darstellbar. In einer früher durchgeführten Untersuchung sollen solche allerdings in einem Fall in Spuren aufgetreten sein (22).

2 Phänomene wurden bei Tumorpatientinnen fast regelmäßig gefunden:

- 1) eine als α -Defekt-Polymer angesehene Bande in der Vorschulter und
- 2) 2 Banden, die in sämtlichen Fraktionen einer Gelfiltration auftraten und die a) Tetra- bzw. Oktomere der α -Kette oder b) Cryoglobuline repräsentieren

könnten.

Inwieweit das Auftreten von α -Defekt-Polymeren in diesen Fällen auf Plasminaktivierung schließen läßt, ist unsicher, da kein abgebautes Fibrinogen außer vielleicht im absteigendem Schenkel des Fibrinogenpeaks nachweisbar war.

E. ZUSAMMENFASSUNG

- 1) SDS-PAA-Disk-Elektrophorese nach Gelfiltration von Einzelproben ist möglich.
- 2) Mit dieser Methode sind Rückschlüsse auf den patho-physiologischen Ablauf der disseminierten intravas-kulären Gerinnung sowie die Hyperkoagulabilität möglich.
- 3) Hyperkoagulabilität ist in der Elektrophorese ge-kennzeichnet durch:
 - a) in Harnstoff und SDS lösliche, hochmolekulare Fibri-nogenderivate,
 - b) α -Kettenverminderung in der Vorschulter
 - c) kein Nachweis von γ - γ -Dimeren.
- 4) Drohende Verbrauchskoagulopathie ohne klinisch ma-nifeste DIG ist in der Elektrophorese erkennbar an:
 - a) Zeichen stark erhöhter Plasminaktivität (=Hyperfi-brinolyse) in Form von größerem Anteil an rascher wanderndem Fibrinogen auch noch im Peak, α -Kettenver-minderung in der Vorschulter,
 - b) in Spuren hochmolekularen, in Harnstoff und SDS nicht löslichen Fibrinogenderivaten und
 - c) u.U. in Spuren auftretenden γ - γ -Dimeren als Zeichen der Faktor XIII-Aktivierung.
- 5) Disseminierte intravaskuläre Gerinnung ist in der Elektrophorese gekennzeichnet durch:
 - a) in Ausschlußvolumen und Vorschulter kein Fibrinogen, sondern nur in Harnstoff und SDS nicht lösliche Fi-brinogenderivate,
 - b) kovalent quervernetzte, d.h. in Harnstoff, SDS und MCA nicht lösliche γ - γ -Dimere,
 - c) γ -Kettenverminderung durch Verbrauch zur Bildung der Dimere und
 - d) Zeichen der Hyperfibrinolyse: rascher wanderndes Fi-brinogen, α -Kettenverminderung in der Vorschulter.

F. LITERATUR

- (1) Documenta Geigy 1968
- (2) Mc Kee, P.A., Mattock, P. and Hill, R.L.
Proc. Nat. Ac. Sci., 66 (1970) 738
- (3) Gollwitzer, R., Timpl, R., Becker, U., Futhmayr, H.
Eur. J. Biochem., 28 (1972) 497
- (4) Meyerhoff, H.E.G. und Schulz, G.V.Z.
Naturforsch., 13b (1958) 773
- (5) Shulman, S.
J. Am. Chem. Soc., 75 (1953) 5846
- (6) Blombäck, B., Blombäck, M., Henschen, A., Hessel, B.,
Iwanaga, S., Woods, K.R.
Nature, 218 (1968) 130
- (7) Mc Kee, P.A., Rogers, L.A., Maler, E., Hill, R.L.
Arch. Biochem. Biophys., 116 (1966) 271
- (8) Mills, D. and Karparkin, S.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 40 (1970) 206
- (9) Hall, C.A. and Slayter, H.S.
J. Biophys. Biochem. Cytol., 5 (1959) 11
- (10) Bachmann, Lund Schmitt-Fumian
Vortrag anlässlich des Fibrinogensymposiums des
SFB 51 in Martinsried am 15.6.1973
- (11) Lorand, L., Chenoweth, D. and Domanik, R.A.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 37 (1969) 219
- (12) Wagner, H.J.
Diplomarbeit, Frankfurt 1970
- (13) Chen, R. and Doolittle, R.F.
Proc. Nat. Acad. Sci. 66 (1970) 472
- (14) Summaria, L., Hsieh, B. and Robbins, K.C.
J. Biol. Chem., 242 (1967) 4279
- (15) Fearnley, G.R. and Tweed, J.M.
Clin. Sci., 12 (1953) 81
- (16) Pizzo, S.V., Schwartz, M.L., Hill, R.L., McKee, P.A.
J. Biol. Chem., 247 (1972) 636
- (17) Marder, V.J., Budzynski, A.Z. and James, H.L.
J. Biol. Chem., 247 (1972) 4775

- (18) Graeff, H., v. Hugo, R., Kuhn, W., Scholz, H., Ernst, A.,
Gastroph, R.
Fibrinogen derivatives with a higher molecular
weight than that of the parent molecule in cord
vein plasma of newborns
Klin. Wschr., 51 (1973) 695
- (19) v. Hugo, R. and Graeff, H.
Formation of soluble fibrin monomer complexes in
human plasma
Thromb. Res., 3 (1973) 183
- (20) Graeff, H., v. Hugo, R. and Hafter, R.
In vivo formation of soluble fibrin monomer com-
plexes in human plasma
Thromb. Res., 3 (1973) 465
- (21) Graeff, H. and v. Hugo, R.
Fibrinogen derivatives in a case of abruptio
placentae
Amer. J. Obstet. Gynec., 120 (1974) 335
- (22) Hafter, R., Tafel, K., Bocaz, J. A., Jilg, W., Graeff, H.
Vortrag anlässlich der DAB-Tagung München 1975
- (23) Hafter, R., Schneeberger, T., Tafel, K., Ernst, E.,
Graeff, H.
Bestimmung von löslichen Fibrinmonomerkomplexen
zur Erfassung der Hyperkoagulabilität in der
Schwangerschaft und unter der Geburt
Geburtsh. u. Frauenheilk., 35 (1975) 518
- (24) Graeff, H. and v. Hugo, R.
Identification of fibrinogen derivatives in plas-
ma samples
Thrombos. Diathes. haemorrh., 27 (1972) 610
- (25) Graeff, H., Wiedemann, A., v. Hugo, R., Hafter, R.
Amount and distribution pattern of soluble fibrin
monomer complexes during the early puerperium
Amer. J. Obstet. Gynec., 124 (1976) 21
- (26) Hafter, R., Graeff, H.
Molecular aspects of defibrination in a Reptilase-

- treated case of "dead-fetus-syndrom"
Thromb.Res.,7 (1975) 391
- (27) Kuhn,W.,Graeff,H.
Gerinnungsstörungen in der Geburtshilfe
Thieme,Stuttgart,1970
- (28) Köller,R.
Dissertationsarbeit,München,1974
- (29) Ernst,A.
Dissertationsarbeit,München,1974
- (30) Marx,R.
Krebs und Blutgerinnung
F.K.Schattauer,Stuttgart,1968,S.101
- (31) Godal,H.C.,Abildgaard,U.
Gelation of soluble fibrin in plasma by ethanol
Scand.J.Haematol.,3 (1966) 342
- (32) Fletcher,A.P.,Alkjaersig,M.,Brien,J.C.
Blood hypercoagulability and thrombosis identification
Abstract volume,XIII.Int.Congress Haematol.,
Munich 1970,p.224
- (33) Graeff,H.and v.Hugo,R.
Identification of fibrinogen derivatives in
plasma samples
Thrombos.Diathes.haemorrh.,27 (1972) 610
- (34) Blombäck,B.,Blombäck,M.
Purification of human and bovine fibrinogen
Arkiv Kemi,10 (1956) 415
- (35) Hörmann,H.,Gollwitzer,R.
Analytische Untersuchungen über Rinderfibrinogen
und -fibrin
Z.Physiol.Chem.,346 (1966) 21
- (36) Seligsohn,U.,Rapaport,S.J.,Kuefler,P.R.
Extra-adrenal effect of ACTH on fibrinogen synthesis
Am.J.Physiol.,224 (1973) 1172

- (37) Godal, H.C., Abildgaard, U., Kierulf, P.
Coagulation, 3/4 (1971) 343
- (38) Ly, B., Kierulf, P., Jakobsen, E.
Stabilization of soluble fibrin/fibrinogen complexes by fibrin stabilizing factor (FSF)
Thromb. Res., 4 (1974) 509
- (39) Jürgen, G., Meyer-Bertenrath
Blutgerinnung und Fibrinolyse
DÄV, 1973, S. 45
- (40) Hafter, R., v. Hugo, R., Müller-Berghaus, G., Graeff, H.
Estimation and characterisation of soluble fibrin monomer complexes (SFMC) during endotoxin induced disseminated intravascular coagulation (DIC)
in prep., 1975
- (41) Dvilansky, A., Britton, A.F.H., Loewy, A.G.
Factor XIII assay by an isotope method. 1. Factor XIII evaluation of screening tests of clot solubility
Brit. J. Haematol., 18 (1970) 399
- (42) Harder, A.J., Straub, P.W.
In vitro and in vivo induction of cryofibrinogen and "paracoagulation" by Reptilase
Thrombos. Diathes. haemorrh., 2 (1972) 337
- (43) Graeff, H.
Habilitationssarbeit 1968
- (44) Graeff, H., Beller, F.K.
Hematological studies during Endotoxin infusions in rabbits
Thrombos. Diathes. haemorrh., 20 (1968) 420

LEBENS LAUF

Am 6.März wurde ich als Sohn des Arztes Dr.Anton Böhm und seiner Frau Hedwig,geb.Eberle in Köln geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule Köln-Weidenpesch wurde ich 1961 in das Staatliche Dreikönigsgymnasium aufgenommen, wo ich 1969 das Abitur ablegte.

Ab Wintersemester 69/70 studierte ich drei Semester Französisch und Medizin an der Universität Liège,Belgien. Im Sommersemester 1971 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Freiburg i.Br.,wo ich im März 1972 die naturwissenschaftliche Vorprüfung ablegte.Zum Wintersemester 1972/73 wechselte ich zur Ludwig-Maximilians-Universität München.Hier legte ich im Oktober 1973 die ärztliche Vorprüfung ab.Am 6.12.1976 bestand ich das Staatsexamen, am 7.12.76 die mündliche Doktorprüfung in München.

gez. Chr.Böhm

Herzlichst danken möchte ich

Herrn Prof.Dr.Graeff für die Überlassung und Betreuung meiner Arbeit

Herrn Dr.Hafter für die Unterstützung bei der Ausarbeitung

Frl.Wellner für die Anfertigung der Photographien

